

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

***Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no
tratamento da otite externa infecciosa**

Eduardo Garcia Fontoura

Pelotas, 2014

EDUARDO GARCIA FONTOURA

***Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa
infecciosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador:

Márcia de Oliveira Nobre

Co-Orientador:

Eduardo Negri Mueller

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F684r Fontoura, Eduardo Garcia
Rosmarinus officinalis L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa / Eduardo Garcia Fontoura. – 50f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária, 2014. – Orientador Márcia de Oliveira Nobre ; co-orientador Eduardo Negri Mueller.

1.Fitoterapia. 2. *Triticum aestivum*. 3.Trigo.
4. *Staphylococcus aureus*. 5. *Staphylococcus aureus*.
6.Alecrim. 7.Otopatias. I.Nobre, Márcia de Oliveira. II.Mueller, Eduardo Negri. III.Título.

CDD: 617.84

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cristina Gevehr Fernandes

Prof^a. Dr^a. Rosema Santin

Prof. Dr. Samuel Rodrigues Felix

Prof^a. Dr^a. Márcia de Oliveira Nobre (orientadora)

Agradecimentos

A Deus em primeiro lugar por me proporcionar uma vida repleta de oportunidades, realizações e principalmente uma família espetacular, cuja qual foi a maior benção concedida.

Aos familiares, pelo apoio, carinho e compreensão não só durante este período, mas ao longo de toda vida.

A minha orientadora Márcia de Oliveira Nobre pela amizade, paciência, confiança e incentivo.

Aos amigos e colegas da graduação e pós-graduação, pelo auxílio e companheirismo em todos os momentos.

Ao apoio e carinho de amigos externos a veterinária, os quais sem dúvida foram peça-chave durante todo tempo.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

A todos aqueles que de certa forma torceram por mim, por minha felicidade e vitória.

“Todos esses que aí estão
Atravancando meu caminho,
Eles passarão...
Eu passarinho!”

Mario Quintana

Resumo

FONTOURA, Eduardo Garcia. ***Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa.** 2014. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A otite externa é a inflamação do conduto auditivo externo, com etiologia infecciosa ou não. Casos de negligência fazem com que ocorram recidivas, dificultando tratamento e elevando a resistência microbiana aos métodos convencionais, tornando assim as plantas medicinais uma alternativa. O *Triticum aestivum* (trigo), já demonstrou ação antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, hepatoprotetor e cicatrizante. O *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) possui propriedades medicinais como antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico, antimutagênico, diurético, expectorante e antioxidante. Neste contexto, objetivou-se avaliar a utilização dos extratos aquosos de trigo e alecrim e óleo essencial de alecrim no tratamento da otite externa infecciosa experimental. A otite externa foi induzida em 64 ratos Wistar através da instilação de óleo de cróton 5% em acetona em conjunto com *Staphylococcus aureus* no conduto auditivo dos animais. Os tratamentos foram divididos em extrato aquoso de trigo 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de alecrim 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de alecrim 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica (GV). Os animais foram tratados por até sete dias e realizadas análises macroscópicas aos quatro, seis e dez dias através do método de Emgård & Hellström para coloração, diâmetro, efusão, além da análise histopatológica, em quatro animais por grupo. Foram observados resultados promissores com o extrato aquoso de trigo (GI), e extrato aquoso de alecrim (GII), sendo capazes de reduzir os parâmetros clínicos macroscópicos, assim como os parâmetros histopatológicos. Nas condições experimentais deste trabalho, a concentração utilizada de óleo essencial não foi efetiva. Assim, demonstrou-se que os extratos aquosos de trigo e alecrim a 25% em propilenoglicol promovem a aceleração da resolução da otite externa infecciosa.

Palavras-chave: Fitoterapia. *Staphylococcus aureus*. Trigo. Alecrim. Otopatias.

Abstract

FONTOURA, Eduardo Garcia. ***Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa.** 2014. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

External otitis is an inflammation of the outer ear and ear canal, which may or may not be of infectious cause. Negligence will lead to recurrence, hampering treatment and causing bacterial resistance to conventional methodologies. In this context, medicinal plants and plant extracts may be an alternative. *Triticum aestivum* (wheat) has been shown to act as an antioxidant, anti-inflammatory, pain-killer, as well as used in wound healing. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) has antibacterial, anti-inflammatory, pain-killer, anti-mutagenic, diuretic, expectorant, and antioxidant effects. In this context, the objective of this study was to assess the use of wheat and rosemary aqueous extracts, and rosemary essential oil, in the treatment of infectious external otitis. Experimental otitis was induced in rats Wistar with croton oil at 5% in acetone, followed by the introduction of *Staphylococcus aureus* in the outer ear canal. Animals were separated according to the treatment group: GI – 25% wheat aqueous extract in propylene glycol; GII – 25% rosemary aqueous extract in propylene glycol; GIII – 5% rosemary essential oil in propylene glycol; GIV – propylene glycol; and GV – saline. The animals were treated for up to seven days, and assessed regarding clinical (according to the Emgard & Hellström method) and histopathological alterations, on days four, six and ten. Promising results were observed on animals treated with both aqueous extracts, primarily in GI (wheat), but also in GII (rosemary), both were able to reduce clinical and histopathological parameters beyond the effect of the control. This study shows that the aqueous extract of both *T. aestivum* and *R. officinalis* promoted the hastening of the healing process of infectious external otitis.

Kay-works: Phytotherapy. *Staphylococcus aureus*. Wheat. Rosemary. Ear Diseases.

Lista de figuras

- Figura 1 Análise cromatográfica do extrato aquoso de *Triticum aestivum* empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, utilizando como padrões: ácido vanílico (1), ácido caféico (2), vanilina (3), ácido p-cumárico (4), ácido ferúlico (5), ácido sinápico (6), rutina (7), ácido rosmarínico (8), quercetina (9), luteolina (10), carnosol (11), ácido carnósico (12), caempferol (13) e apigenina (14)..... 39
- Figura 2 Análise cromatográfica do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, utilizando como padrões: ácido vanílico (1), ácido caféico (2), ácido siríngico (3), vanilina (4), ácido p-cumárico (5), ácido ferúlico (6), ácido sinápico (7), rutina (8), ácido rosmarínico (9), quercetina (10), luteolina (11), carnosol (12), ácido carnósico (13), caempferol (14) e apigenina (15)..... 39
- Figura 3 Análise cromatográfica do óleo essencial de alecrim por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama (GC/FID), utilizando-se como padrões α -pineno (1), canfeno (2), β -pineno (3), mirceno (4), α -terpineno (5), *p*-cimeno (6), limoneno (7), 1,8-cineol (8), terpinoleno (9), linalol (10), 4-terpineol (11), α -terpineol (12), timol (13) e carvacrol (14)..... 39
- Figura 4 Percentual de orelhas com alteração de coloração após tratamento com extrato aquoso de *T. aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *R. officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *R. officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV); quatro,

seis e dez dias após a indução da otite. (a) Representa diferença, no mesmo dia, ($p < 0,05$) para o GIV (propilenoglicol) e (b) representa diferença ($p < 0,05$) para o GV (solução fisiológica)..... 40

Figura 5 Percentual de orelhas com alteração de diâmetro luminal após tratamento com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV); quatro, seis e dez dias após a indução da otite. (a) Representa diferença, no mesmo dia, ($p < 0,05$) para o GIV (propilenoglicol) e (b) representa diferença ($p < 0,05$) para o GV (solução fisiológica)..... 40

Figura 6 Percentual de orelhas com alteração de efusão após tratamento com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV); quatro, seis e dez dias após a indução da otite. (a) Representa diferença, no mesmo dia, ($p < 0,05$) para o GIV (propilenoglicol) e (b) representa diferença ($p < 0,05$) para o GV (solução fisiológica)..... 41

Figura 7 Somatório das médias dos escores referentes à análise histopatológica dos grupos tratados com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV) aos quatro, seis e dez dias..... 41

Sumário

1	Introdução.....	11
2	Objetivos.....	13
3	Revisão bibliográfica.....	14
3.1	Anatomia e conformidades da orelha externa.....	14
3.2	Microclima do conduto auditivo	14
3.3	Otite externa.....	15
3.3.1	Etiologia.....	16
3.3.2	Fatores primários.....	16
3.3.3	Fatores predisponentes	17
3.3.4	Fatores perpetuantes.....	17
3.3.5	Sinais clínicos.....	18
3.3.6	Diagnóstico.....	18
3.3.7	Tratamento	18
3.4	Otite externa experimental	19
3.4.1	Óleo de cróton	19
3.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.4.3	Concentração Inibitória Mínima	20
3.5	Plantas Medicinais	21
3.6	<i>Triticum aestivum</i>	22
3.7	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	23
4	Artigo	25
5	Conclusões	42
6	Referências.....	44
7	Apêndice.....	50

1 Introdução

A orelha dos animais é constituída basicamente de três partes, a orelha externa, média e interna. A principal função do ouvido é traduzir ondas sonoras em mensagens neurais. O conduto auditivo externo possui características que em condições normais mantém um equilíbrio de suas funções, essas características são compostas por pH, umidade, temperatura, microrganismos comensais, folículos pilosos, aeração, glândulas secretoras, dentre outros.

A otite externa é caracterizada por ser a inflamação do conduto auditivo externo, seja ela de origem infecciosa ou não, uni ou bilateral, aguda ou crônica, com exsudato ceruminoso ou purulento. Os mecanismos causadores desta enfermidade podem ser divididos em fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários são propriamente os causadores da inflamação, os fatores predisponentes são mecanismos facilitadores de distúrbios, os quais favorecem o desencadeamento da doença, e por fim os fatores perpetuantes são aqueles que dificultam a resolução do quadro. Uma das causas primárias destes distúrbios são bactérias estranhas à microbiota comensal da orelha.

O *Staphylococcus aureus*, é uma bactéria comensal da microbiota cutânea humana e animal, porém altamente resistente, patogênica e causadora de diversas infecções. Basicamente, o tratamento da otite externa gira em torno do controle de microrganismos, porém a utilização de forma errônea de antimicrobianos vem predispondo a resistência bacteriana e dificultando a resolução deste quadro. A otite externa não é considerada um fator de risco a vida animal, porém a dor intensa causada pelo processo inflamatório, os danos ocasionados em longo prazo, a elevada casuística, acrescidos do custo do tratamento e demais dificuldades, fazem com que esta seja uma doença de extrema relevância na clínica médica de pequenos animais.

A utilização de fitoterápicos não é recente, ao longo dos anos vários são os relatos da utilização de plantas como auxiliares na resolução das mais diversas doenças. O *Triticum aestivum*, conhecido como trigo, é uma gramínea de ciclo anual pertencente à família Poaceae, sendo um dos principais compostos da alimentação

humana. Historicamente, já foram relatadas várias utilizações para esta planta, porém atualmente estão sendo comprovados alguns de seus sítios de atuação, como antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano, entre outras. O alecrim, *Rosmarinus officinalis* L., é uma planta aromática, membro da família Lamiaceae (Labiatae), sendo amplamente distribuída em todo mundo. Seus compostos já foram descritos como com ação anti-inflamatório, antimutagênico, antioxidante, antimicrobiano, entre outras.

Em âmbito de proporcionar novos métodos de tratamento de forma eficaz a doenças de relevância, a utilização de fitoterápicos torna-se uma ótima alternativa visando o baixo custo inicial, a ampla margem de captação de matéria-prima e o potencial terapêutico deste nicho. Porém, como qualquer composto químico, doses eficazes e tóxicas devem ser diferenciadas, evitando prejuízo à saúde humana e animal.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi testar a utilização do extrato aquoso de *Triticum aestivum*, do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. e do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., como adjuvantes no tratamento da otite externa infecciosa experimental. Para cumprir com o objetivo, se procedeu extensa revisão bibliográfica acerca dos fitoterápicos propostos, bem como os mais diversos aspectos da otite canina. Esta revisão esta apresentada no item 3 deste manuscrito. Apoiado nas informações desta revisão, se desenhou diversos experimentos específicos, sendo os seus resultados reunidos na forma de um artigo intitulado “*Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa experimental em modelo murino”, formatado para publicação para o periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira”, no item 4 desta dissertação.

2 Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a utilização do extrato aquoso de *Triticum aestivum*, do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. e do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. no tratamento da otite externa infecciosa experimentalmente induzida em ratos Wistar.

Objetivos específicos

- Obter e caracterizar componentes nas amostras de extrato aquoso de *T. aestivum*, extrato aquoso e óleo essencial de *R. officinalis* L.;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos aquosos de *T. aestivum* e *R. officinalis* L. e do óleo essencial de *R. officinalis* L. frente a bactérias do gênero *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar o efeito do tratamento com extrato aquoso de *T. aestivum* e extrato aquoso e óleo essencial de *R. officinalis* L., sobre os parâmetros clínicos da otite externa infecciosa experimental;
- Avaliar o efeito do tratamento da otite externa infecciosa com extrato aquoso de *T. aestivum* e extrato aquoso e óleo essencial de *R. officinalis* L., sobre parâmetros histopatológicos.

3 Revisão bibliográfica

O reconhecimento da orelha normal é de extrema importância para detecção de alterações e assim se estabeleça o protocolo de tratamento correto para que se obtenha sucesso em cada patologia específica (GRIFFIN, 2006; NJAA; COLE; TABACCA, 2012). Dentre as otopatias nos animais de companhia a otite externa recebe destaque por sua elevada casuística (MANISCALCO et al., 2009).

3.1 Anatomia e conformidades da orelha externa

A orelha pode ser dividida em três regiões: orelha externa, média e interna. O ouvido externo por sua vez é dividido em pinna (porção cartilaginosa ou pavilhão externo) e meato acústico externo (porção vertical e horizontal) até a separação para o ouvido médio pela membrana timpânica (COLE, 2009; NJAA; COLE; TABACCA, 2012). A principal função do ouvido é transformar as ondas sonoras em mensagens neurais para interpretação do sistema nervoso, e também atuar no controle do equilíbrio, este exercido pelo ouvido interno (HEINE, 2004). Em cães, cada raça possui suas particularidades quanto à conformação da orelha externa, podendo ser pendular, semi-pendular ou ereta (COLE, 2009). A maioria dos felinos possui o pavilhão auricular externo ereto, porém modificações genéticas estão fazendo com que surjam variações neste aspecto (NJAA; COLE; TABACCA, 2012).

3.2 Microclima do conduto auditivo

O ouvido externo possui características únicas, tais particularidades fazem com que se crie um ambiente normal onde estão presentes microrganismos comensais, folículos pilosos, aeração, pH, temperatura, glândulas sebáceas, ceruminosas e apócrinas (NOBRE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005; MALAYERI; JAMSHIDI; SALEHI, 2010). Estes fatores podem ser influenciados pela raça do animal, predispondo a alterações com o decorrer do tempo principalmente, quando

se leva em consideração a conformação da orelha externa, quantidade de glândulas e folículos pilosos (HEINE, 2004; COLE, 2009; NJAA; COLE, TABACCA, 2012).

Cães com orelhas pendulares são mais propensos a infecções de ouvido que cães com orelhas eretas, independente destes últimos terem maior quantidade de folículos pilosos no conduto auditivo ou não (COLE, 2009). Ainda, os animais que agregam características como orelha pendular, maior quantidade de folículos pilosos ou canal auditivo reduzido de diâmetro, conseqüentemente diminuem a aeração local, fazendo com que haja aumento da temperatura e umidade. Este fato favorece o crescimento de bactérias oportunistas e, conseqüentemente a ocorrência de infecções. A umidade, tanto do conduto auditivo externo como do ambiente, já foi descrita como fator predisponente para otite externa (NASCENTE et al., 2006). O pH do epitélio sadio fica entre 4,6 e 7,2, em casos de otite externa aguda este pH sofre alcalinização girando em torno de 5,2 a 7,2 e casos crônicos de 6 até 7,4. (COLE, 2009). Casos em que há elevação do pH do conduto auditivo podem favorecer o crescimento de microrganismos (MUELLER, 2011; NJAA; COLE; TABACCA, 2012).

O cerúmen é caracterizado por ser a emulsão das secreções glandulares em conjunto com células epiteliais, a orelha sadia possui cerúmen em pequenas quantidades formando uma barreira protetora, este por sua vez também age como antimicrobiano deixando o pH baixo (COLE, 2009; NJAA; COLE; TABACCA, 2012). Porém o pH do conduto auditivo pode alcalinizar conforme aumenta a secreção de cerúmen (COLE, 2009).

Mesmo que em pequena quantidade, o conduto auditivo externo possui microrganismos patogênicos que se mantêm sob controle em circunstancias normais. Os microrganismos mais comumente isolados no conduto auditivo sadio são *Staphylococcus* sp. e *Malassezia pachydermatis* (NOBRE et al., 2001; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007).

3.3 Otite externa

A otite externa caracteriza-se por ser a inflamação do conduto auditivo externo, podendo ser de etiologia infecciosa ou não (MURPHY, 2001; ROSSER JUNIOR, 2004), uni ou bilateral, aguda ou crônica e seu exsudado ceruminoso ou purulento (MUELLER et al., 2011a). É uma doença de elevada prevalência na rotina clínica de pequenos animais, estima-se que aproximadamente 20% dos cães

encaminhados ao atendimento apresentem a doença (LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007; PENNA et al., 2011). Porém, muitas vezes a doença é negligenciada ou posta em segundo plano, tanto pelo médico veterinário quanto pelo proprietário, sendo muitas vezes um desafio de diagnóstico e tratamento (GRIFFIN, 2006; MALAYERI; JAMSHIDI; SALEHI, 2010).

3.3.1 Etiologia

A otite é uma doença comum em cães, mas também pode estar presente em felinos, sendo que nestes a maior ocorrência da doença é de origem parasitária (BAPTISTA et al., 2010). Diversos fatores podem desencadear a inflamação da orelha externa, podendo ser divididos em fatores predisponentes, primários e perpetuantes. Para o sucesso do tratamento é essencial à identificação do fator desencadeante da doença (ROSSER, 2004; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007).

3.3.2 Fatores primários

São estes fatores que desencadeiam de forma inicial a doença. A identificação e tratamento dos fatores primários são essenciais para que haja resolução do quadro clínico (MURPHY, 2001; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007). Nesta categoria encontram-se causas parasitárias (as quais são a principal forma desencadeante de otite em felinos podendo chegar a 50% dos casos), sendo os principais ácaros o *Otodectes cynotis*, *Demodex canis*, *Otobius megnini*, *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*, *Cheyletiella spp.*, e *Eutrombicula sp.* Ainda neste grupo estão as doenças autoimunes, doenças endócrinas, assim como hipersensibilidade, doenças alérgicas, neoplasias e corpos estranhos (NASCENTE et al., 2006; MUELLER et al., 2009). A hipersensibilidade e alergia são citadas por Rosser (2004) como a maior causa de otite crônica ou recorrente em cães, principalmente por dermatite atópica ou alergia alimentar, indicando que respectivamente 55% e 80% dos cães com dermatite atópica e alergia alimentar apresentam otite externa concomitante.

3.3.3 Fatores predisponentes

As causas predisponentes são aquelas que não causam diretamente a otite externa, porém aumentam o risco da ocorrência da doença. Muitos destes fatores acarretam em alteração do microclima normal, que, associado a outros fatores primários ou perpetuantes, irão causar a otite externa (MURPHY, 2001; NASCENTE et al., 2006). Neste grupo destacam-se principalmente causas relacionadas à anatomia e genética. Exemplos são cães com orelhas pendulares, excesso de pelos e/ou estenose do conduto auditivo, entre outros, que fazem com que haja dificuldade de drenagem e aeração no conduto auditivo (ROSSER, 2004).

Sabe-se que cães das raças Poodle, Cocker Spaniel Inglês, Fila brasileiro e Pastor alemão possuem maior predisposição ao desenvolvimento de otite, ainda que a incidência em cães sem raça definida também seja elevada (NOBRE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005; FERNÁNDEZ et al., 2006). O excesso de umidade no conduto auditivo pode ser um fator predisponente a otite externa, a umidade age macerando o epitélio do estrato córneo diminuindo assim a barreira protetora contra infecções. Tratamentos utilizados de forma errônea, ou até mesmo a limpeza inadequada também podem ocasionar lesões no epitélio auricular (ROSSER, 2004; NASCENTE et al; 2006; SANTOS A. L. et al., 2007).

3.3.4 Fatores perpetuantes

Este grupo abrange as causas que não desencadeiam diretamente a doença no conduto auditivo, porém dificultam sua resolução. São causas que devem ser tratadas concomitantemente com a afecção primária ou não haverá resolução do quadro. Podendo ser de causas bacterianas, fúngicas ou também otite média (ROSSER, 2004; NASCENTE et al., 2006).

As características fisiológicas do conduto auditivo fazem com que haja presença de microrganismos, porém, tais condições fazem com que ocorra um equilíbrio desta flora e estes não se tornem patogênicos, até que ocorra algum distúrbio que favoreça seu desenvolvimento (NOBRE et al., 1998; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007). Dentre os microrganismos mais comumente isolados estão às leveduras *Malassezia pachydermatis* e *Candida* sp., assim como as bactérias *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas* spp, *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium* sp.

(NOBRE et al., 2001; ROSSER, 2004; OLIVEIRA et al., 2005; FERNÁNDEZ et al., 2006; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007; MALAYERI; JAMSHIDI; SALEHI, 2010; MUELLER et al., 2011a; MUELLER, 2011; PENNA et al., 2011; BUGDEN, 2012).

3.3.5 Sinais clínicos

Os sinais clínicos compreendem principalmente prurido, dor a palpação e/ou incomodo, pender ou balançar a cabeça, secreção ceruminosa em excesso ou purulenta, eritema, edema, ulcerações, odor fétido, assim como podem ser visualizados na porção externa da orelha sinais de escoriações e autotraumas. Nos casos de cronicidade estes sinais clínicos também podem cursar com estenose do canal auditivo e dificuldade de audição (ROSSER, 2004; NASCENTE et al. 2006; MUELLER, 2009).

3.3.6 Diagnóstico

Para o diagnóstico da otite externa uma anamnese minuciosa é sempre importante, perguntas como tempo de evolução do quadro, progressão, outros tratamentos ou outras áreas do corpo afetadas devem estar sempre presentes, visando à pesquisa por uma possível causa primária (MURPHY, 2001). Ainda, o médico veterinário deve lançar mão do exame clínico geral e específico através da otoscopia, podendo ser auxiliado por exames complementares, como cultura, antibiograma, citologia auricular, biopsia, raio-x (MURPHY, 2001; LEITE, 2003; ROSSER, 2004; LINZMEIER; ENDO; LOT, 2009) e vídeo-otoscopia (MANISCALCO et al., 2009), tomografia, ressonância magnética ou também otoscopia virtual 3D, a qual permite navegação por imagem ao longo das superfícies internas de um modo semelhante à vídeo-otoscopia convencional (CHO et al., 2012).

3.3.7 Tratamento

Para um tratamento efetivo a identificação do agente primário causador da doença é de suma importância (ROSSER, 2004), porém de maneira geral o alvo terapêutico de maior importância tornam-se os microrganismos (LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007). Independente do fator causador, a limpeza do

conduto auditivo deve ser sempre levada em consideração como auxílio no tratamento (NUTTALL; COLE, 2004). O propilenoglicol é um álcool orgânico, viscoso, incolor, inodoro, higroscópico, solvente e emulsificante, sendo considerada uma substância de baixa irritabilidade, ainda, em algumas concentrações o propilenoglicol pode ser considerado com ação queratolítica e antimicrobiana. Por essas características, o propilenoglicol é utilizado amplamente como veículo para formulações de produtos da linha dermatológica e soluções otológicas (NUTTALL; COLE, 2004; GELLER et al., 2010).

Contudo, são inúmeros os casos de negligência durante o tratamento de otite, o que resulta em recidiva e evolução para casos crônicos, fato que eleva resistência bacteriana, custo de tratamento e, muitas vezes, culminam com a necessidade de procedimentos cirúrgicos para resolução do quadro (GRIFFIN, 2006; NASCENTE et al., 2006; LINZMEIER; ENDO; LOT, 2009).

3.4 Otite externa experimental

O diagnóstico da otite externa é relativamente simples, porém a cronicidade e a dificuldade de tratamento de alguns casos podem levar a condições de frustração (MURPHY, 2001). A utilização errônea de medicamentos antimicrobianos favorece a resistência bacteriana, dificultando o controle de diversas doenças. Ainda, a utilização das mesmas moléculas para o tratamento humano e animal faz com que haja uma dificuldade no controle dos medicamentos (LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007; MALAYERI; JAMSHIDI; SALEHI, 2010).

Estudos *in vivo* com modelos experimentais estão sendo utilizados para melhor reproduzir as condições de ocorrência das doenças e assim poder afirmar a capacidade real dos compostos de melhor ação (ALTINER et al., 2007; TAKAKI et al., 2008; MENGONI et al., 2010; BENINCÁ et al., 2011; MUELLER, 2011; KAHN; ANSARI; AHMAD, 2013). Visto a importância da otite externa, são necessários estudos para ampliar as formas de tratamento, diminuindo também o tempo para resolução da doença.

3.4.1 Óleo de cróton

O óleo de cróton é extraído de uma planta (*Spareiflorus croton*) que possui em sua composição derivados de phorbol e diterpenos tóxicos. A interação entre os

ésteres de phorbol e a proteína quinase celular afeta a atividade de enzimas, a biossíntese de proteínas, de DNA, poliaminas, entre outras substâncias resultando em modificações no processo de diferenciação celular e expressão gênica. O phorbol por si só é um composto co-carcinogênico, sendo sua atuação favorável ao crescimento tumoral através do desencadeamento do processo inflamatório (GOEL et al., 2007). Já o processo inflamatório tem o objetivo de eliminar a causa inicial da lesão, provocada por patógenos ou agentes físicos. A área inflamada exibe aspectos marcantes macroscopicamente como eritema, edema e alteração da função normal do local. Através da resposta imune inata, o processo inflamatório faz com que ocorra vasodilatação local e migração celular ao local lesado, provocando aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente extravasamento de exsudato para o interstício que resultará em edema (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

3.4.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva facilmente isolada de animais sadios e humanos, sendo frequentemente causadora de diversas formas de infecções. Sua importância está relacionada ao alto grau de resistência, capacidade de mutação e elevada patogenicidade (GUILLET; HALLIER; FELDEN, 2013). Segundo Santos R. R. et al. (2007), a quantidade de toxinas produzidas pelo *S. aureus* pode induzir formas diferentes de resposta em cada hospedeiro, responsável pelas manifestações clínicas e determinando um diferenciado grau de severidade em cada infecção.

3.4.3 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) visa demonstrar a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir determinado microrganismo. O teste não reproduz fielmente o ponto de inibição ou valor absoluto, porém é aproximado de forma que é possível sua utilização com segurança. Mas ainda, para que se reproduzam resultados satisfatórios e ainda fieis, é recomendado utilizar duas vezes o ponto final obtido no teste (CLSI, 2005).

3.5 Plantas Medicinais

Ao longo da história os homens sempre buscaram na natureza recursos para sua sobrevivência como alimentos, moradia, medicamentos e vestimenta (GIRALDI; HANAZAKI, 2010). As plantas medicinais são importantes recursos terapêuticos, principalmente para nações em desenvolvimento, sua utilização é comum e faz parte da cultura popular, passando o conhecimento da medicina caseira por gerações. O exercício da medicina fitoterápica é uma prática sociocultural que deve ser mais bem observada. A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem fomentando a utilização de fitoterápicos desde 1978, visando uma maior aceitação por parte dos profissionais da saúde, assim como o aumento da utilização pela população (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIAS, 2008). Porém, os fitoterápicos ainda abrangem grande parte do comércio informal, o que representa um risco a saúde, pois qualquer produto químico pode ser um agente tóxico em potencial (CORDEIRO et al., 2006b).

Diversas plantas apresentam em suas composições agentes fenólicos (HERNÁNDEZ et al., 2011). Recentemente vem aumentando o interesse neste material visando principalmente sua excelente ação como antioxidante através da inibição de radicais livres, além de suas ações como anti-inflamatório, antimutagênico e anticancerígeno. Os ácidos fenólicos são encontrados em grãos na forma livre, conjugada solúvel ou insolúvel, porém a concentração em cada planta varia conforme inúmeros fatores como o clima, o cultivo, seus cultivares anteriores, entre outros (DINELLI et al., 2011; HUNG; HATCHER; BARKER, 2011).

As substâncias fenólicas são potentes antioxidantes *in vitro*, as quais agem protegendo os constituintes lipídicos da oxidação. Julga-se que as mesmas tenham um papel importante na prevenção de muitas doenças crônico-degenerativas. Taninos são metabólitos secundários de grande interesse por suas propriedades adstringente, antimicrobiana, antisséptica, impermeabilizante cutânea e de mucosas (BELE; JADHAV; KADAM, 2010). Flavonóides são um dos grupos mais importantes e diversificados de origem vegetal. São amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontrados em frutas, cascas de árvores, raízes, talos e flores. Diversas atividades biológicas são descritas para estes compostos, como antioxidantes, antiviral, antitumoral e anti-inflamatório (MACHADO et al., 2008; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

A atenção em relação à utilização das plantas medicinais vem aumentando nos últimos anos, e há a necessidade de maiores estudos, pois os fitoterápicos representam uma alternativa economicamente viável a população e ainda há a necessidade da desmistificação de que as plantas medicinais “*in natura*” não causam intoxicação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Grande parte dos efeitos adversos observados oriundos da medicina popular dificilmente são difundidos pela população até o alcance dos usuários, sendo necessária também a divulgação de programas de farmacovigilância, para que ocorra a difusão do conhecimento tóxico destes produtos, mas principalmente que seus efeitos adversos sejam conhecidos de forma antecipada para que ocorra a redução dos riscos relativos a sua utilização (CORDEIRO et al, 2006b; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIAS, 2008). A introdução da medicina moderna traz benefícios a práticas de saúde a locais onde ocorre somente a medicina tradicional, porém deve haver o cuidado para que não haja a sobreposição de uma a outra, e sim a complementaridade das duas (GIRALDI; HANAZAKI, 2010).

3.5.1 *Triticum aestivum*

O *Triticum aestivum* (*T. aestivum*, sinônimo *T. vulgare*) (BARBIERI; STUMPF, 2008), conhecido popularmente como trigo, há muitos anos é um dos principais componentes da dieta humana. O trigo é uma gramínea de ciclo anual pertencente à família Poaceae (WHENT et al., 2012). Já foram identificados compostos fenólicos e flavonóides em grandes proporções em vários cultivares de trigo oriundos de diversas regiões, demonstrando ser uma excelente fonte de antioxidantes fenólicos. Assim, seu consumo beneficia a saúde por meio da prevenção da ocorrência de doenças crônicas ou ainda cardiovasculares, diabetes, câncer, entre outras (DINELLI et al., 2011; HERNÁNDEZ et al., 2011).

Os grãos de trigo demonstraram serem ricos em compostos fenólicos de alto poder antirradical, que contribuem para maior parte da atividade antioxidante. Antioxidantes são compostos que podem atrasar ou impedir no dano oxidativo celular (DINELLI et al., 2009; DINELLI et al., 2011).

O efeito cicatrizante do trigo através da diminuição do tempo de cicatrização de feridas já foi testado e comprovado, tanto em equinos (RIBAS et al., 2005; SOUZA et al., 2006) em feridas cirúrgicas em gatas (GODEIRO et al., 2010), em

lesão de córnea felinos e cães (GALERA et al., 2005), ou também acelerando o processo em lesão por queimaduras por radiação ionizante (ANDRADE et al., 2010), além de aumentarem a força de tensão em feridas induzida em animais experimentais (TILLMANN, 2011). Tal ação é decorrente da presença de fitoestimulinas que agem sobre os fibroblastos exercendo efeito mitogênico e estimulando sua capacidade de sintetizar fibras de colágeno e glicosaminoglicanos (SOLARZONO et al., 2001).

O efeito bactericida já foi observado também em feridas quando administrado creme a base de trigo. Inicialmente, as feridas foram classificadas como contaminadas, ao final do experimento não havia contaminação dos animais tratados com trigo, diferente do observado nos animais do grupo controle (GODEIRO et al., 2010). Outra pesquisa com feridas contaminadas também demonstrou a ação bactericida ou bacteriostática quando utilizado o tratamento com trigo (MATERA et al., 2002). Mais recentemente, sementes de trigo foram utilizadas para confecção de extrato etanólico onde foi testada sua atividade antioxidante e hepatoprotetora em animais experimentais. Os resultados foram positivos em ambas as análises (KAHN; ANSARI; AHMAD, 2013).

3.5.2 *Rosmarinus officinalis* L.

O *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.) é uma erva nativa da região do mediterrâneo, porém amplamente distribuída pelo mundo, incluindo o Brasil. O *R. officinalis* L. é membro da família Lamiaceae (Labiatae) e popularmente conhecido como alecrim. Ainda que muito utilizado como alimento e conservante, o alecrim tem seu uso desde a antiguidade por suas propriedades medicinais, dentre elas a ação antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, analgésica, antimutagênica, diurética, expectorante e antioxidante (PINTORE et al., 2002; ALVARENGA et al., 2007; BOZIN et al., 2007; PACKER; LUZ, 2007; TAKAKI et al., 2008; AFONSO; SANT'ANA; MANCINI-FILHO, 2010, BENINCÁ et al., 2011; CLEFF et al. 2012; ROSA et al., 2013).

O alecrim já demonstrou ter em sua composição taninos e flavonóides, os quais são responsáveis pelos resultados positivos das diversas formas onde é empregado (CORDEIRO et al., 2006a; CORDEIRO et al., 2006b; ALTINIER et al., 2007). Bozin et al. (2007) desafiou o óleo essencial de alecrim por cromatografia

gasosa e analisou sua atividade antioxidante e antimicrobiana contra 13 estirpes de bactérias e fungos. Os resultados demonstraram a ação antimicrobiana e antioxidante, através da capacidade de eliminação dos radicais livres e principalmente ação antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, e *Shigella sonnei*. A atividade bacteriostática e fungicida também foi comprovada frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, através da utilização de óleo de alecrim por Packer & Luz (2007).

Os efeitos do extrato e seus compostos purificados, oriundos de folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* L. foi testado por Mengoni et al. (2010) utilizando como tratamento com os principais compostos com ação anti-inflamatória já descrita, sua ação foi testada através da indução da inflamação em orelha de ratos. Os resultados foram analisados através da expressão de vários genes associadas à inflamação. Foi observado que compostos isolados a base de ácido carnósico e carnosol em extrato etanólico inibiram significativamente a inflamação.

Ainda, o efeito anti-inflamatório do óleo essencial de alecrim também foi testado de forma experimental no edema plantar em animais, foi observado o volume de exsudado e a migração de leucócitos para o local. O óleo demonstrou ação quando administrado por via oral e intrapleural através da observação da inibição do edema no membro afetado, tanto por redução do exsudato inflamatório como do número de leucócitos. Também, quando administrado ácido acético via intraperitoneal, o óleo apresentou resultados satisfatórios, indicativos de atividade antinociceptiva (TAKAKI et al., 2008).

4 Artigo

***Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa experimental em modelo murino**

Formatado sob as normas de revista Pesquisa Veterinária Brasileira

***Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa experimental em modelo murino¹**

Eduardo G. Fontoura²; Eduardo N. Mueller³; Taís T. Zambarda⁴; Samuel R. Felix²; Cristina G. Fernandes²;

Rogério A. Freitag⁷; Márcia O. Nobre²

ABSTRACT – Fontoura E.G., Mueller E.N., Zambarda T.T., Felix S.R., Fernandes C.G., Freitag R.A., Nobre M.O. [***Rosmarinus officinalis* L. and *Triticum aestivum* in the treatment of infectious otitis externa.**] *Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-0. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, 96010-900 Pelotas, RS, Brasil. Email: eduardogfontoura@gmail.com

External otitis is an inflammation of the outer ear and ear canal, which may or may not be of infectious cause. The use of medicinal plants is reported extensively since the beginning of human history. Foremost among these are wheat (*Triticum aestivum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The purpose of this study was to assess the use of *T. aestivum* aqueous extract, and *R. officinallis* aqueous extract and essential oil as adjuvants in the treatment of experimentally induced external otitis. External otitis was induced in wistar rats through the inoculation of *S. aureus*. The animals were divided into five groups receiving different treatments: GI – 25% wheat aqueous extract in propylene glycol; GII – 25% rosemary aqueous extract in propylene glycol; GIII – 5% rosemary essential oil in propylene glycol; GIV – propylene glycol; and GV – saline. The animals were treated every 24 hours for seven days. To assess the treatment's effects, the Emgard & Hellström method was applied on days four (D4), six (D6), and ten (D10). Ear structures for histopathological assays were also performed on the same dates. Promising results were observed on animals treated with both aqueous extracts, primarily in GI (wheat), but also in GII (rosemary) both were able to reduce clinical and histopathological parameters beyond the effect of the control. On the other hand, none of the treatment groups were able to control the *S. aureus* infection, with the agent still present by day ten. This study shows that the aqueous extract of both *T. aestivum* and *R. officinallis* promoted the hastening of the healing process of infectious external otitis in rats, and these extracts may be considered when composing a potential treatment, especially in association with antibiotics.

INDEX TERMS: Wheat, rosemary, phytotherapics, *Staphylococcus aureus*, ear diseases, Inflammation

Resumo - A otite externa é a inflamação do conduto auditivo externo, podendo ser de etiologia infecciosa ou não. A utilização de plantas como medicamentos vem sendo relatada extensivamente ao longo dos anos, entre as quais estão o trigo (*T. aestivum*) e o alecrim (*R. officinallis* L.). O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do extrato aquoso de *T. aestivum* e do extrato aquoso e óleo essencial de *R. officinalis* L. no tratamento da otite externa infecciosa experimental. Para tanto foram utilizados 64 ratos Wistar, estes foram induzidos de forma experimental para otite externa e inoculados com *S. aureus*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de acordo com o tratamento: extrato aquoso de trigo 25%

¹ Recebido em...

Aceito em...

² Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão – Cx. Postal: 354 Eliseu Maciel, Jardim América, Capão do Leão – RS 96160-000 Brasil. *Autor para correspondência: eduardogfontoura@gmail.com

³ Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia – Cx. Postal: 283, Vila Frágoso, Concórdia – SC 89700000 Brasil.

⁴ Colegiado de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel, Campus Capão do Leão – Cx. Postal: 354, Eliseu Maciel, Jardim América, Capão do Leão – RS 96160-000 Brasil.

⁵ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química e Geociência, UFPel, Campus Capão do Leão – Cx. Postal: 354, Jardim América, Capão do Leão – RS 96160-000 Brasil.

em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de alecrim 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de alecrim 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica (GV). Os animais foram tratados a cada 24 horas por sete dias. Para avaliação, foram feitas análises, aos quatro (D4), seis (D6) e dez dias (D10), através do método de Emgård & Hellström, para coloração, diâmetro luminal e efusão, assim como análise histopatológica. Foram observados resultados promissores com o extrato aquoso de trigo (GI), seguido do extrato aquoso de alecrim (GII), sendo capazes de reduzir os parâmetros avaliados macroscopicamente e perante as análises histopatológicas, porém nenhum dos grupos foi capaz de controlar a infecção por *S. aureus*. Assim, demonstrou-se que os extratos aquosos de *T. aestivum* e *R. officinalis* L. promovem a aceleração da resolução da otite externa infecciosa, sendo potencial para tratamentos que associem antimicrobianos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Trigo, alecrim, fitoterápicos, *Staphylococcus aureus*, otopatias, inflamação.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamento no auxílio à resolução de doenças vem sendo relatada extensivamente ao longo dos anos (Giraldi & Hanazaki 2010). Por seu potencial terapêutico e baixo custo até a utilização, países em desenvolvimento vêm dando ênfase a este tipo de medicamentos (Silveira, Bandeira & Arraias 2008). Sendo o Brasil o país com a maior biodiversidade do planeta, é natural que haja interesse por meio da população e demais órgãos governamentais, além do setor privado, na utilização dessa diversidade como alternativa aos produtos alopáticos (Parcker & Luz 2007, Ministério da Saúde 2009). Contudo, o uso indiscriminado e de forma empírica levam há um alto risco de intoxicações, podendo gerar danos à saúde humana e animal (Cordeiro et al. 2006, Silveira et al. 2008).

Conhecido como trigo, o *Triticum aestivum* (*T. aestivum*, sinônimo *T. vulgare*) (Barbieri & Stumpf 2008), é uma gramínea de ciclo anual pertencente à família Poaceae, sendo um dos principais compostos da dieta humana (Whent et al. 2012). Características terapêuticas vêm sendo atribuídas ao trigo, principalmente sua ação na cicatrização de feridas cutâneas (Tillmann, 2011), antioxidante (Souza et al. 2006), antibacteriano (Solórzano et al. 2006, Godeiro et al. 2010) e também hepatoprotetora (Khan et al. 2013). O *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.) é uma planta aromática, membro da família Lamiaceae (Labiatae), popularmente conhecido como alecrim, encontrada em diversas áreas do mundo, como Europa, Ásia, África e América do Sul. O alecrim é amplamente utilizado por suas propriedades antibacterianas, analgésica, antimutagênica, diurética, expectorante e antioxidante (Pintore et al. 2002, Bozin et al. 2007, Takaki et al. 2008, Afonso, Sant`Ana & Mancini-filho 2010, Rosa et al. 2013).

A otite externa é a inflamação do conduto auditivo externo, podendo ser de etiologia infecciosa ou não, considerada uma das enfermidades mais comum em cães (Rossier 2004; Mueller et al. 2011). O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva facilmente isolada de indivíduos sadios, sendo frequentemente causadora de infecções. Sua importância está relacionada ao alto grau de resistência, capacidade de mutação e elevada patogenicidade (Santos et al. 2007, Guillet, Hallier & Felden 2013). Os métodos de diagnóstico da otite canina baseiam-se na observação dos sinais clínicos, anamnese minuciosa, exame clínico geral e específico do conduto auditivo, podendo também se empregar métodos

auxiliares (Nascente et al. 2006). Muitas vezes a etiologia multifatorial dificulta o tratamento desta enfermidade, mas de forma geral, a eliminação dos microrganismos se torna o principal objetivo terapêutico. No entanto, a resistência a antimicrobianos vem aumentando de forma exponencial por erros em sua utilização, bem como pelo uso das mesmas classes de antimicrobianos na medicina humana e na clínica de pequenos animais (Lyskova, Vydrzalova & Mazurova 2007, Malayeri, Jamshidi & Salehi 2010).

Neste contexto, objetivou-se avaliar a utilização do extrato aquoso de *T. aestivum*, do extrato aquoso e óleo essencial de *R. officinalis* L. no tratamento da otite externa infecciosa em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção, extração dos produtos e análise cromatográfica

O trigo foi colhido manualmente na região de Jaguarão/RS. As amostras de alecrim foram adquiridas comercialmente de fornecedor com referência (Luar Sul⁵). Amostras do trigo foram enviadas ao Herbário da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) para que fossem identificadas e catalogadas. As plantas foram secas, trituradas e encaminhadas ao Laboratório de Oleoquímica e Biodiesel do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPel, para a extração dos produtos. Para a obtenção dos extratos aquosos de trigo e alecrim, foi utilizada a técnica de ultrassom por esgotamento. Já para o óleo essencial de alecrim, foi utilizada a técnica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Após a extração, o óleo foi seco em Na₂SO₄ anidro, grau p.a., concentrado sob N₂ ultra puro e mantido sob refrigeração.

Uma alíquota do produto final de cada um dos extratos e óleo essencial foi enviada para realização de cromatografia, visando à identificação de compostos considerados de importância para o estudo. O óleo essencial de alecrim foi submetido à análise em equipamento CG/FID (Schimadzu, modelo 2010) equipado com coluna de sílica DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm). Foram preparadas uma solução do óleo a 5000mgL⁻¹ em hexano e uma solução de 40mgL⁻¹ de padrões cromatográficos (α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-terpineno, *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, terpinoleno, linalol, 4-terpineol, α-terpineol, timol e carvacrol). Os constituintes foram identificados por comparação do tempo de retenção dos padrões e das amostras.

Os extratos aquosos foram analisados empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o equipamento da Varian® com detector de arranjo de diodos (DAD) com varredura de 200 a 800nm., coluna cromatográfica com fase estacionária C18 Phenomenex Gemini (25cm x 4,6mm x 5µm) e uma pré-coluna de mesma fase. Os compostos separados foram monitorados com DAD. Para o extrato aquoso de alecrim foram pesquisados: ácido vanílico, ácido caféico, ácido siríngico, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, rutina, ácido rosmarínico, quercetina, luteolina, carnosol, ácido carnósico, caempferol e apigenina. Quanto ao extrato aquoso de trigo, foram pesquisados: ácido vanílico, ácido caféico, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, rutina, ácido rosmarínico, quercetina, luteolina, carnosol, ácido carnósico, caempferol e apigenina.

⁵ Luar Sul Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios LTDA, Santa Cruz do Sul/RS.

Preparo dos tratamentos

Para a determinação das concentrações efetivas dos extratos e óleo essencial foi realizada a CIM dos produtos sobre o agente estudado. Foi utilizada a técnica de microdiluição em placa de 96 poços conforme documento M7-A6 para bactérias aeróbicas (CLSI 2005) com modificações para o óleo essencial. Em função de o óleo essencial ser lipossolúvel, e incapaz de misturar-se com os outros compostos utilizados na técnica, o ensaio de CIM para este foi mantido em agitador a 90 RPM durante as etapas de incubação. Os resultados foram expressos em através da cultura do conteúdo dos poços em meio ágar-sangue e em lâminas de microscopia. Todo o processo foi realizado em triplicata, da diluição de 100% até 1/512. Porém, não foram observados resultados compatíveis com a inibição do *S. aureus* por meio de crescimento no meio de cultura.

As concentrações utilizadas para confecção dos tratamentos obtiveram base em resultados considerados eficientes em estudos demonstrados anteriormente. Foram observados resultados satisfatórios quando utilizado o extrato aquoso de trigo no tratamento da otite externa não infecciosa (Mueller 2011), assim, neste experimento optou-se por elevar a dose até 25% de extrato aquoso de trigo, visto a presença de bactérias. Para confecção dos tratamentos a base de alecrim foram utilizadas concentrações consideradas ideais com extrato aquoso de alecrim 25% e óleo essencial de alecrim 5% (Silva et al. 2009). Os tratamentos foram preparados em farmácia de manipulação comercial em veículo de propilenoglicol, tanto para os extratos aquosos de alecrim e trigo, quanto para o óleo essencial de alecrim.

Animais experimentais

Foram utilizados 64 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, fêmeas, com 60 dias e peso aproximado de 180g, provenientes do Biotério Central da UFPel. Os animais foram mantidos em condições recomendadas de bem-estar, recebendo ração e água *ad libitum*. O experimento recebeu parecer favorável da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA - 7866).

Para o desenvolvimento da otite externa os animais foram previamente anestesiados com sulfato de atropina (5mg/kg) por via subcutânea, seguido de anestesia dissociativa com quetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intramuscular. As orelhas dos 64 animais (n=128) foram inoculadas com 80µL de óleo de cróton 5% em acetona. Transcorrido um minuto, as orelhas foram novamente inoculadas com 100µL de solução contendo o agente infeccioso *Staphylococcus aureus*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 12 ratos, totalizando 24 orelhas por grupo. Os grupos foram divididos por tratamento em: extrato aquoso de *T. aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *R. officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *R. officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), e os grupos controle, propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV). Vinte e quatro horas após a indução da otite, os animais foram tratados através da instilação de 100µL da solução respectiva de seu tratamento no conduto auditivo externo. Os animais foram tratados por até sete dias a cada 24 horas, sendo que aos quatro (D4), seis (D6) e dez dias (D10), quatro animais por grupo foram anestesiados, avaliados e eutanasiados, por sobredose anestésica, conforme resolução nº1000 do CFMV de 2012.

O *S. aureus* utilizado era proveniente de um caso de otite externa crônica em cão. A cepa foi isolada, repicada em meio ágar-sangue e posteriormente inoculada por via intraperitoneal em ratos

Wistar para que houvesse aumento dos padrões de patogenicidade nesta espécie. Após 48 horas os animais foram anestesiados e eutanasiados por overdose anestésica, conforme resolução nº 1000 do CFMV de 2012. Foram coletados pulmão, cérebro, fígado e baço para novamente isolar o agente bacteriano desejado, agora expressando fatores patogênicos para a espécie desejada.

Avaliação clínica

Vinte e quatro horas após a indução da otite, as orelhas foram avaliadas por vídeo-otoscopia utilizando o escore descrito por Emgård & Hellström (1997), com modificações. Os parâmetros avaliados foram: coloração, diâmetro luminal e efusão. A cada parâmetro foi atribuído um valor, sendo o maior escore indicando a pior condição clínica. Para coloração os parâmetros foram classificados em normal (0), vermelho (1) e vermelho intenso (2). Na avaliação do diâmetro luminal ou edema, foram utilizadas sondas uretrais e classificados conforme a passagem da sonda nº8 (0), sonda nº6 (1), sonda nº4 (2) e incapacidade de passagem da sonda nº4 (3). A classificação da efusão no conduto auditivo externo foi em seco (0), úmido (1) e otorrêa obstruindo o conduto auditivo (2). Ao término da avaliação somente foram tratadas as orelhas que obtiveram somatório igual ou superior a três, indicativo da ocorrência de otite. Para diminuir a margem de erro clínico individual, os parâmetros foram analisados com o auxílio de três avaliadores, previamente treinados, cegados quanto aos grupos.

Histopatologia

Para a análise histopatológica foram sorteadas cinco orelhas por grupo, as quais foram dissecadas e armazenadas em formalina 10% para envio ao Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da UFPel. As amostras foram incluídas em parafina, submetidas a cortes histológicos de 5µm, coradas com eosina-hematoxilina e avaliadas em microscópio óptico (400X). Os cortes foram avaliados quanto ao epitélio do conduto auditivo (degeneração, necrose, úlcera, espongirose, hiperqueratose e acantose), indicativos de inflamação (quantidade celular, hiperemia, tipo celular e distribuição), quantidade de glândulas presentes (quantidade e alterações) e luz do conduto auditivo.

Análise estatística

Para analisar os resultados todos os grupos foram comparados entre si nos diferentes dias de tratamento, tanto para as análises clínicas quanto histopatológicas. Para comparar a presença ou ausência de determinada alteração, foi utilizado o teste Fisher, através do *software* GraphPad quickcalcs. Para avaliar a diferença nos escores percebidos, foi utilizado o ensaio de Kruskal-Wallis, calculado através do *software* Statistix 9.0.

RESULTADOS

Análise cromatográfica

A análise cromatográfica para o extrato aquoso do *T. aestivum* revelou a presença do ácido p-cumarínico, ácido carnósico, apigenina, caempferol e quercetina (Figura 1). O extrato aquoso de *R. officinalis* L. demonstrou a existência de 11 dos 15 compostos pesquisados na amostra, sendo eles: ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido rosmarínico, ácido ferúlico, ácido vanílico, carnosol, carnósico, ácido

apigenina, luteolina, caempferol, quercetina (Figura 2). Já o óleo essencial continha como majoritários os compostos α -pineno e 1,8-cineol, além da presença de outros 12 (canfeno, β -pineno, mirceno, α -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, terpinoleno, linalol, 4-terpineol, α -terpineol, timol e carvacrol) (Figuras 3).

Avaliação clínica

Extrato aquoso de *Triticum aestivum* 25% em propilenoglicol (GI)

Durante a primeira análise para coloração (D4) foi observada alteração em 54,2% das orelhas, um resultado inferior ao dos grupos GIII e GV ($p < 0,01$). Este número foi acrescido para 62,5% no D6, mantendo esse parâmetro menor que o GIII, bem como o grupo controle (GIV) ($p < 0,01$). No último dia (D10) houve queda significativa chegando somente a 16,7% das orelhas com essa alteração, porém, ainda que o GI tenha tido menos orelhas com coloração alterada em todo o decorrer do experimento, diferiu apenas do GIII no D10 (Figura 4). Quanto ao diâmetro luminal das orelhas deste grupo, somente 20,8% apresentaram alteração no D4, sendo que nos dias posteriores de avaliação o número de orelhas alteradas caiu à zero, esse resultado representa uma diferença de todos os demais grupos no decorrer do experimento (Figura 5). Quando observados os resultados para efusão, 54,2% das orelhas apresentaram alteração no primeiro momento de avaliação (D4), chegando a 91,7% no D6 e 8,3% no D10. Esse parâmetro se apresentou semelhante ao de coloração, onde no D10 este grupo era inferior ao controle (GIV) e ao GIII (Figura 6). A comparação estatística completa para todos os grupos pode ser vista nas figuras 4, 5 e 6.

Extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII)

GII apresentou 79,2% de orelhas com alteração no D4, 75% e 29,2% de orelhas alteradas no D6 e D10, respectivamente, para o padrão de coloração. Quando observados para o diâmetro luminal, GII apresentou 100% das orelhas alteradas no D4, 75% no D6 e posteriormente 12,5% de alteração no D10. Para efusão, 87,5% das orelhas apresentaram alteração no D4 e D6, decrescendo para 16,7% das orelhas na avaliação do D10. Estatisticamente este grupo obteve melhores resultados em comparação com GIV no D6 para coloração ($p < 0,05$) e efusão ($p < 0,01$) no D10. A comparação com os demais grupos pode ser vista nas figuras 4, 5 e 6.

Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII)

Nas avaliações clínicas para coloração os animais pertencentes à GIII apresentaram respectivamente 91,7%, 95,8% e 79,2% de orelhas alteradas nos dias D4, D6 e D10. Para o parâmetro de edema ou diâmetro luminal, GIII apresentou uma queda progressiva, sendo observadas alterações em 100% das orelhas no D4, alteração em 60% das orelhas no D6 e nenhuma alteração nas orelhas avaliadas no D10. Para efusão, haviam alterações em 87,5% das orelhas no D4, em 95,8% das orelhas no D6 e 45,8% das orelhas com padrão alterado em D10. O óleo essencial de *R. officinalis* L. a 5% demonstrou piores resultados quando comparados com GIV no D4 para diâmetro luminal e no D10 para coloração ($p < 0,01$).

Propilenoglicol (GIV)

No grupo controle do veículo, tratado somente com propilenoglicol (GIV), foram observadas alterações para coloração em 66,7% das orelhas no D4, em 100% das orelhas no D6, regredindo a 25% de orelhas alteradas no D10. O GIV também oscilou seus resultados para o diâmetro luminal, apresentando 37,5%, 83,3% e 0% de orelhas alteradas respectivamente nos D4, D6 e D10. Para efusão presente no conduto auditivo constatou-se alteração em 62,5% das orelhas no D4, enquanto que no D6 foram observadas em 100% e no D10 em 58,3% das orelhas. Estes resultados foram melhores que os do grupo controle negativo (GV) em todos os parâmetros no D4, porém sendo piores no D6 para coloração ($p < 0,05$) e no D10 para quantidade de efusão ($p < 0,01$).

Solução Fisiológica de NaCl 0,9% (GV)

Dos animais pertencentes ao GV, 100% apresentaram alterações de coloração nas orelhas no D4, reduzindo para 66,7% ao D6 e 25% no D10. Para diâmetro luminal foi observada 75% das orelhas alteradas no primeiro momento, seguido de 100% e 0% no D6 e D10, respectivamente. Quanto aos resultados para efusão, foi visualizado alteração em 100% das orelhas deste grupo no D4 e D6, porém somente 8,3% das orelhas apresentaram alteração no D10. A análise estatística completa pode ser vista nas figuras 4, 5 e 6.

Histopatologia

A análise dos cortes histológicos demonstrou que o grupo GI apresentou constante queda nos parâmetros do D4 até D10, porém este não foi o grupo com menores alterações. O somatório das médias alçadas por GII e GIII também apresentaram queda do D4 até D6, sendo observado leve aumento no D10. O controle com o veículo a base de propilenoglicol (GIV), foi quase que constante de D4 a D6, porém durante a análise dos parâmetros em D10, seus escores apresentaram elevação acentuada, fazendo com que fosse o grupo com o maior índice de alterações em D10. Os animais tratados com solução fisiológica (GV) oscilaram seus escores demonstrando elevação do D4 até D6, decrescendo novamente no D10 (Figura 7).

As análises realizadas levando em consideração a quantidade celular, o tipo celular e a presença de hiperemia demonstraram que, para os padrões de quantidade e tipo celular, não foram observadas diferenças entre os tratamentos em nenhum dos dias. Quanto à presença de hiperemia, no D4, o grupo tratado com extrato aquoso de trigo demonstrou maiores alterações, chegando a 100% dos analisados, enquanto os demais grupos não demonstraram diferença significativa com relação ao controle (GIV). Em um segundo momento de avaliação (D6), nenhum dos grupos demonstrou diferença significativa entre si ou entre o controle do veículo, somente contra o controle negativo (GV), o qual apresentou 80% das orelhas com alterações.

DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que o extrato aquoso de trigo, na formulação de 25% em propilenoglicol, contribui para diminuição dos padrões inflamatórios da otite externa infecciosa

experimental. Os resultados demonstram a diminuição de todos os padrões clínicos analisados macroscopicamente e ainda a constante queda nas alterações histopatológicas do grupo (GI). Compostos encontrados no trigo já foram descritos como potenciais alvos farmacêuticos por sua ação cicatricial, anti-inflamatória e antioxidante (Galera et al. 2008, Godeiro et al. 2010), bem como por conter em sua composição diversos fatores bioativos e quimiopreventivos (Solórzano et al. 2001). Os maiores escores apresentados no primeiro momento (D4), podem ser decorrentes da indução inicial da otite, provocada pelo óleo de cróton, em conjunto com a ação mitogênica e de atração celular do trigo (Godeiro et al. 2010). Essa ação faz alusão ao estímulo gerado pelo trigo sobre fibroblastos e as células endoteliais que são estimuladas a proliferação ceratinocítica, fazendo com que haja uma aceleração no tempo de cicatrização do local lesado (Souza et al. 2006, Galera et al. 2008, Tillmann 2011). Em estudo semelhante, Mueller (2011) observou o efeito benéfico do extrato aquoso de *T. vulgare* no conduto auditivo externo de animais experimentais, quando analisados critérios para otite externa não infecciosa.

O alecrim já foi descrito em diversos estudos por sua ação como modulador da inflamação e antimicrobiana, principalmente *in vitro* (Cordeiro 2006, Altiner et al. 2007; Bonzin et al. 2007, Packer & Luz 2007, Takaki et al. 2008). Quando testada a ação anti-inflamatória do extrato de alecrim e suas porções separadamente, foram observados resultados satisfatórios principalmente com efeito inibitório de leucócitos e mediadores inflamatórios (Benincá et al. 2011, Mengoni et al. 2011, Rosa et al. 2013). Tal ação justifica os resultados positivos apresentados pelo extrato aquoso de *R. officinalis* L. neste estudo, mesmo não sendo o mais eficaz entre os tratamentos avaliados, este promoveu a diminuição dos parâmetros analisados, com destaque aos resultados apresentados pela análise histopatológica das orelhas, onde o extrato aquoso de *R. officinalis* L. apresentou queda progressiva das alterações, durante o período de estudo (Figura 7).

Ainda que os compostos terpenos apresentados pela análise cromatográfica do óleo essencial possuam ação já descrita em outros estudos como modulador inflamatório, antioxidante, antibacteriana, fungistática (Bonzin et al. 2007, Parker Luz 2007, Cleff et al. 2012), antimutagênica e quimiopreventiva (Pintore et al. 2002, Altiner et al. 2007, Takaki et al. 2008, Afonso, Sant`Ana & Mancini-filho 2010), o óleo essencial não alçou resultados satisfatórios, sendo muitas vezes semelhantes ou inferiores aos obtidos pelos grupos controle (GIV e GV). Assim, nosso estudo corrobora com resultados obtidos por Mueller (2011), que usou o óleo essencial de alecrim 25% em veículo de propilenoglicol para tratar otite externa não infecciosa. Altiner et al. (2007) classificaram o óleo essencial como incapaz de induzir efeito anti-inflamatório em orelhas de animais experimentais, quando observados aspectos referentes a edema, porém destaca o efeito anti-inflamatório dos seus componentes não voláteis em conjunto com outros veículos. Por outro lado, Takaki et al. (2008) demonstraram que o óleo essencial de alecrim foi capaz de inibir o edema agudo induzido de forma experimental, quando administrado por via oral. Dessa forma, os efeitos benéficos do óleo de alecrim parecem estar ligados a características específicas de sua constituição, variações na ocorrência e proporção dos compostos podem estar ligadas ao local onde a planta é cultivada, o que justifica a variação de resultados entre os autores. Sendo assim, ainda que o óleo essencial de alecrim não tenha apresentado resultados promissores nesse estudo, componentes específicos devem ser avaliados. Outro fator que pode ter influenciado os resultados é a baixa concentração utilizada nesse estudo, entretanto, essa foi determinada por ensaio de concentração inibitória mínima conforme

recomendado (CLISI 2005), mais que isso, já foi demonstrado que concentrações mais altas desse óleo apresentam efeitos adversos (Mueller 2011).

O propilenoglicol é um álcool orgânico, higroscópico, considerado uma substância de baixa irritabilidade. Por essas características, o propilenoglicol é utilizado em larga escala como veículo para formulações de produtos da linha dermatológica e soluções otológicas (Nuttall & Cole 2004). Porém, as orelhas tratadas somente com propilenoglicol oscilaram seus escores consideravelmente, uma possível causa é sua ação higroscópica em conjunto com a irritabilidade do conduto auditivo, visto que já foram relatados casos de dermatite por contato deste composto, em altas concentrações (Geller et al. 2010), em conjunto com o óleo de cróton e o agente infeccioso.

Conforme esperado, o grupo controle negativo, tratado com solução fisiológica, apresentou os escores mais altos, apresentado mais alterações que os demais. A solução fisiológica pode aumentar a umidade no conduto auditivo causando a maceração do epitélio, o que favoreceria a instalação da bactéria inoculada causando maiores danos (Rosser 2004, Santos et al. 2007, Guillet, Hallier & Felden 2013). Ainda assim, eram esperadas alterações em maior quantidade por parte do processo inflamatório causado pelo phorbol e *S. aureus*. O óleo de cróton possui em sua composição derivados de phorbol e diterpenos tóxicos. O phorbol por si só é um composto co-carcinogênico, culminando em processo inflamatório (Goel et al. 2007). Porém, a utilização de uma bactéria oriunda de outra espécie, por mais que adaptada inicialmente, ainda pode ter seus fatores de patogenicidade diminuídos, visto o tempo de inoculação e o início do tratamento. Segundo Santos et al. (2007), a quantidade de toxinas produzidas pelo *S. aureus* pode induzir formas diferentes de resposta em cada hospedeiro, responsável pelas manifestações clínicas e determinando um diferenciado grau de severidade em cada infecção.

A histopatologia demonstrou indícios da ação pró-inflamatória dos extratos aquosos de trigo e alecrim, principalmente quando analisados os resultados referentes à hiperemia, os grupos GI e GII demonstraram resposta positiva no D4, decaindo a zero no D6, sendo presentes novamente no D10. Este fato também pode ser relacionado aos padrões celulares presentes, onde em todos os grupos foram visualizados quantidade substancial de células mononucleares e polimorfonucleares. Os polimorfonucleados são células encontradas nos primeiros momentos da resposta inflamatória, podendo estar presentes até o quinto dia de lesão e regredindo em quantidade conforme o tempo de evolução. Os polimorfonucleados possuem grande participação na resposta inflamatória pela fagocitose de bactérias. Já os mononucleados aumentam em quantidade com o passar do tempo, aparecendo em maior quantidade a partir do terceiro dia (Mandelbaum, Santis & Mandelbaum, 2003). A presença destas células dá indícios da ação reparadora presente na inflamação (Kim & Deutschman, 2000)

Situações onde se faz necessária utilização de antimicrobianos e anti-inflamatórios são corriqueiras, tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. O potencial efeito já descrito para o uso do *T. aestivum* e do *R. officinalis* L., torna estas plantas uma alternativa para situações onde os medicamentos alopáticos tradicionais são ineficazes ou mesmo tóxicos ao organismo. A facilidade de obtenção da matéria prima, assim como seu espectro de atuação, geram um horizonte promissor para sua utilização, porém ainda são necessários estudos mais aprofundados de seus compostos isolados, visando uma melhor forma de utilização. Da mesma maneira, estudos que enfoquem o sinergismo destas plantas também devem ser considerados.

CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, os extratos aquosos de *Triticum aestivum* e *Rosmarinus officinalis* L. possuem efeito na diminuição dos sinais clínicos e histopatológicos associados à otite externa infecciosa experimental, apresentando-se como possíveis auxiliares no tratamento da enfermidade. A formulação proposta de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. não foi eficaz nas mesmas condições experimentais.

Agradecimentos – Ao CNPq (processo 305072/2012-9) e CAPES pela bolsa de pós-graduação e auxílio no desenvolvimento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Afonso, M.S., Sant`ana L.S. & Mancini-Filho, J. 2010. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Nutrire: revista de Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, 35(1):129-148.
- Altiner G., Sosa S., Aquino R.P., Mencherini T., Loggia R.D. & Tubaro A. 2007. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:1718-1723.
- Barbieri R.L. & Stumpf E.R. 2008. Origem e evolução de plantas cultivadas. 1 ed. Brasília: Embrapa Clima Temperado, p.820.
- Benincá J.P., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G. & Fröde T.S. 2011. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food Chemistry*, 124:468-475.
- Bonzin B., Dukic N. M., Samojlik I. & Jovin E. 2007. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(19):7879–7885.
- Cleff M.B., Meinerz A.R.M., Madrid I., Fonseca A.O., Alves G. H., Meireles M.C.A. & Rodrigues M. R. A. 2012. Perfil de susceptibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(1):43-49.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Reference method for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7 – A6.
- Cordeiro C.H.G., Sacramento L.V.S., Corrêa M.A., Pizzolitto A.C. & Baub T.M. 2006. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(3):395-405.
- Emgard P. & Hellström, S. 1997. An animal model for external otitis. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 254:115-119.
- Galera P.D., Falcão M.S.A., Ribeiro, C.R., Valle, A.C.V. & Laus J.L. 2008. Utilization of the aqueous extract of *Triticum vulgare* (Bandvet®) after superficial keratectomy in domestic cats afflicted with corneal sequestrum. *Ciência Animal Brasileira*, 9(3):714-720.
- Geller M., Filho A.B., Cunha K.S.G., Slaibi E.B., Abreu C.S. & Barbosa J.S.S. 2010. Avaliação imunodermatológica da resposta ao propilenoglicol e ao butilenoglicol - revisão bibliográfica sistemática. *RBM: Revista Brasileira de Medicina*, 67(7):234-239.

- Giraldi M. & Hanazaki N. 2010. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, 24(2):395-406.
- Godeiro J.R.G., Batista J.S., Reis P.F.C.C., Olinda R.G., Vale R.G., Calado E.B., Barros L.E.S., Oliveira A.F. & Feijó F.M.C. 2010. avaliação da atividade cicatrizante de creme à base de *Triticum vulgare* em feridas cutâneas de gatas submetidas à ovariossalpingohisterectomia. *Acta Veterinaria Brasilica*, 4(2):78-85.
- Goel G., Makkar H.P.S., Francis G. & Becker K. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology*, 26:279-288.
- Guillet J., Hallier M. & Felden B. 2013. Emerging Functions for the *Staphylococcus aureus* RNome. *PLOS Pathogens*. 9(12):1-13.
- Khan G. M., Ansari S. H. & Ahmad F. 2013. Pharmacognostic standardization, antioxidant and free radical scavenging activity of the seeds of *Triticum aestivum* L. - A dietary staple. *Journal of Young Pharmacists*. (5):54-59.
- Lyskova P., Vydrzalova M. & Mazurova J. 2007. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. *Journal Veterinary Medicine*. (54):559-563.
- Malayeri G. Z., Jamshidi S. & Salehi T. Z. 2010. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Veterinary Research Communications*, (34):435-444.
- Mandelbaum S. H., Di Santis E. P. & Mandelbaum M. H. S. 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 78(4):525-542.
- Mengoni E. S., Vichera G., Rigano L. A., Puela M. L. R., Galliano S. R., Cafferata E. E., Pivetta O. H., Moreno S. & Vojnov, A. A. 2011. Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia*. (82):414-428.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 2009. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF.
- Mueller Eduardo Negri. 2011. Microclima do canal auditivo de cães e efeito do *Rosmarinus officinalis* L. e do *Triticum vulgare* o tratamento da otite externa experimental. Tese de Doutorado em Sanidade Animal, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 76p.
- Mueller E.N., Guiot E. G., Wilhen G., Fernandes C.P.M., Schusch L.F.D., Nobre, M.O. 2011. Otite externa ceruminosa e purulenta e purulenta em cães. *A Hora Veterinária*. 30:38-40.
- Nascente P.S., Cleff M.B., Rosa C.S., Santos D.V., Meireles M.C.A. & Mello J.R.B. 2006. Otite externa em pequenos animais: uma revisão. *MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*, 4(11):52-59.
- Nuttall T. & Cole L.K. 2004. Ear cleaning: the UK and US perspective. *Veterinary Dermatology*, 15(2):127-136.
- Packer, J.F. & Luz, M.M.S. 2007. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1):102-107.
- Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto, G., Tomi F., Chessa M., Cerri R. & Casanova J. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*. (17):15-19.

- Rosa J. S., Facchin B. M., Bastos J., Siqueira M. A., Micke G. A., Dalmarco E. M., Pizzolatti M. G. & Frödre T. S. 2013. Systemic Administration of *Rosmarinus officinalis* Attenuates the Inflammatory Response Induced by Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy. *Planta Medica*. (79):1605–1614.
- Rosser E. J. Jr. 2004 Causes of otitis externa. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*. (34):459–468.
- Santos, A. L., Santos D. O., Freitas C. C., Ferreira B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R. & Castro H. C. 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 43(6):413-423.
- Silva, M. T. N., Ushimaru, P. I., Barbosa, L. N., Cunha, M. L. R. S., Fernandes Junior, A. 2009. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 11(3):257-262.
- Silveira P. F., Bandeira M. A. M. & Arraias P. S. D. 2008. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(4):618-626.
- Solórzano O. T, Hurtado H. R, López J. L. V, Paquetín J. Á & Aribay M. V. 2001. Evaluación de la actividad reepitelizante del *Triticum vulgare* en la cervicitis crônica erosiva. *Revista de la Facultad de Medicina-UNAM*, 44(1):79-83.
- Souza D. W., Machado T. S. L., Zoppa A. L. V., Cruz R. S. F., Gárrague A. P. & Silva L. C. L. C. 2006. Ensaio da aplicação de creme à base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 8(3):9-13.
- Takaki I., Bersani L.E.A.; Vendruscolo A., Sartoretto S.M., Diniz S.P., Bernani C.A.A. & Cuman R.K.N. 2008. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, 11(4):741-746.
- Tillmann M.T. 2011. Anti-sépticos e fitoterápico na cicatrização de feridas. 52f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas,RS. 52p.
- Went M., Huang H., Xie Z., Lutterodt H., Yu L., Fuerst E. P., Morris C. F., Yu, L. L. & Luthria D. 2012. Phytochemical Composition, Anti-inflammatory, and Antiproliferative Activity of Whole Wheat Flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60:2129–2135.

Legendas de Figuras

Figura 1 – Análise cromatográfica do extrato aquoso de *Triticum aestivum* empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, utilizando como padrões: ácido vanílico (1), ácido caféico (2), vanilina (3), ácido p-cumárico (4), ácido ferúlico (5), ácido sinápico (6), rutina (7), ácido rosmarínico (8), quercetina (9), luteolina (10), carnosol (11), ácido carnósico (12), caempferol (13) e apigenina (14).

Figura 2 – Análise cromatográfica do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, utilizando como padrões: ácido vanílico (1), ácido caféico (2), ácido siríngico (3), vanilina (4), ácido p-cumárico (5), ácido ferúlico (6), ácido sinápico (7), rutina (8), ácido rosmarínico (9), quercetina (10), luteolina (11), carnosol (12), ácido carnósico (13), caempferol (14) e apigenina (15).

Figura 3 – Análise cromatográfica do óleo essencial de alecrim por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama (GC/FID), utilizando-se como padrões α -pineno (1), canfeno (2), β -pineno (3), mirceno (4), α -terpineno (5), *p*-cimeno (6), limoneno (7), 1,8-cineol (8), terpinoleno (9), linalol (10), 4-terpineol (11), α -terpineol (12), timol (13) e carvacrol (14).

Figura 4 – Percentual de orelhas com alteração de coloração após tratamento com extrato aquoso de *T. aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *R. officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *R. officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV); quatro, seis e dez dias após a indução da otite. (a) Representa diferença, no mesmo dia, ($p < 0,05$) para o GIV (propilenoglicol) e (b) representa diferença ($p < 0,05$) para o GV (solução fisiológica).

Figura 5 – Percentual de orelhas com alteração de diâmetro luminal após tratamento com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV); quatro, seis e dez dias após a indução da otite. (a) Representa diferença, no mesmo dia, ($p < 0,05$) para o GIV (propilenoglicol) e (b) representa diferença ($p < 0,05$) para o GV (solução fisiológica).

Figura 6 - Percentual de orelhas com alteração de efusão após tratamento com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV); quatro, seis e dez dias após a indução da otite. (a) Representa diferença, no mesmo dia, ($p < 0,05$) para o GIV (propilenoglicol) e (b) representa diferença ($p < 0,05$) para o GV (solução fisiológica).

Figura 7 – Somatório das médias dos escores referentes à análise histopatológica dos grupos tratados com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 25% em propilenoglicol (GI), extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* L. 25% em propilenoglicol (GII), óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 5% em propilenoglicol (GIII), propilenoglicol (GIV) e solução fisiológica de NaCl 0,9% (GV) aos quatro, seis e dez dias.

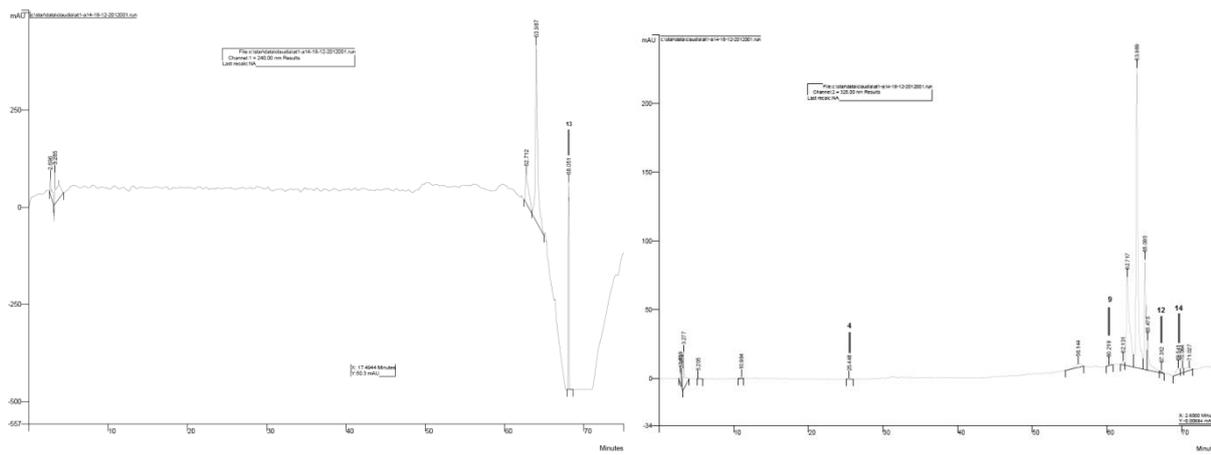


Figura 1

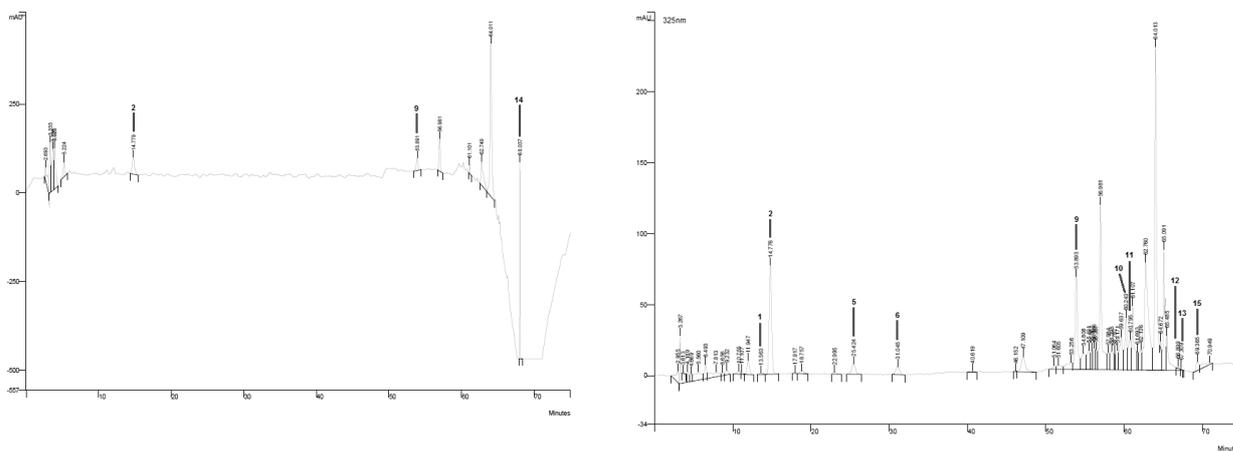


Figura 2

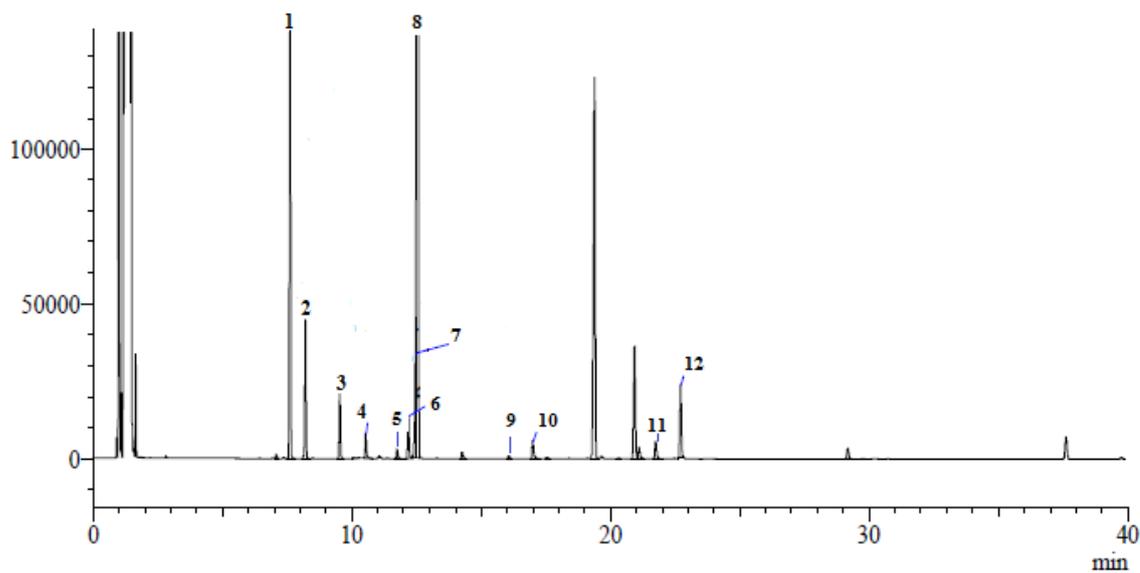


Figura 3

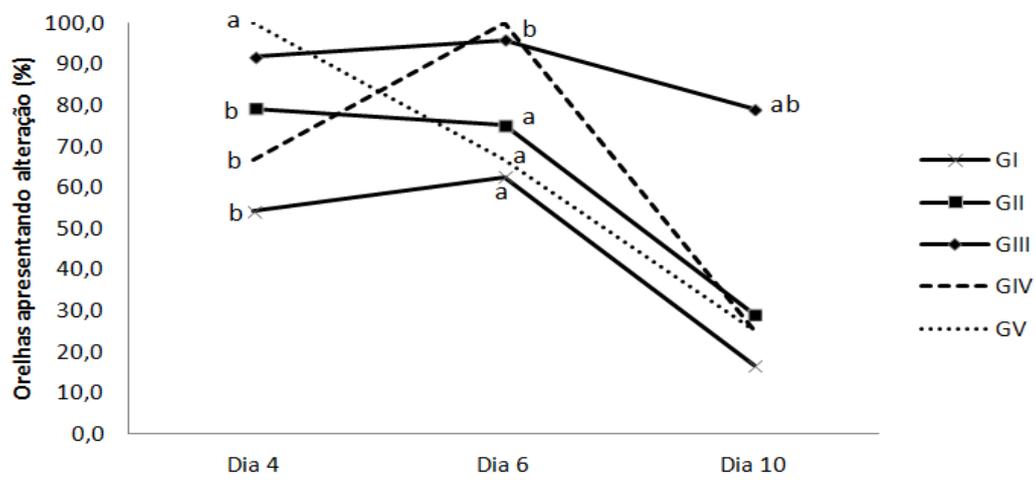


Figura 4

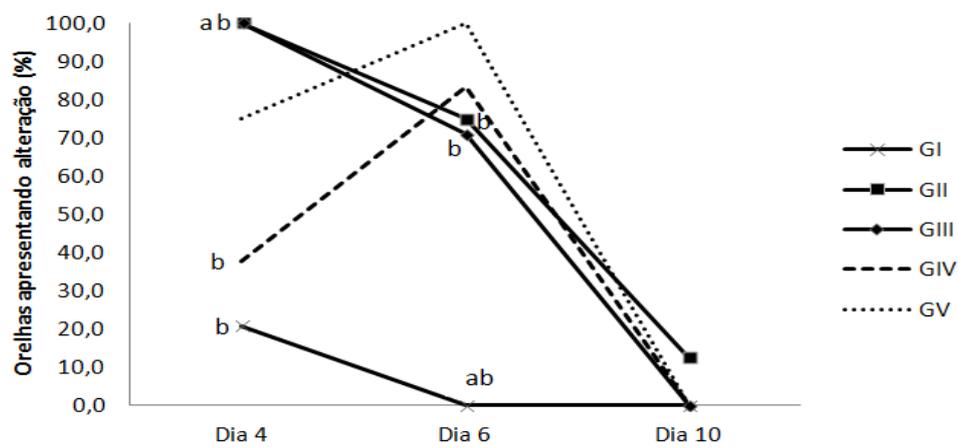


Figura 5

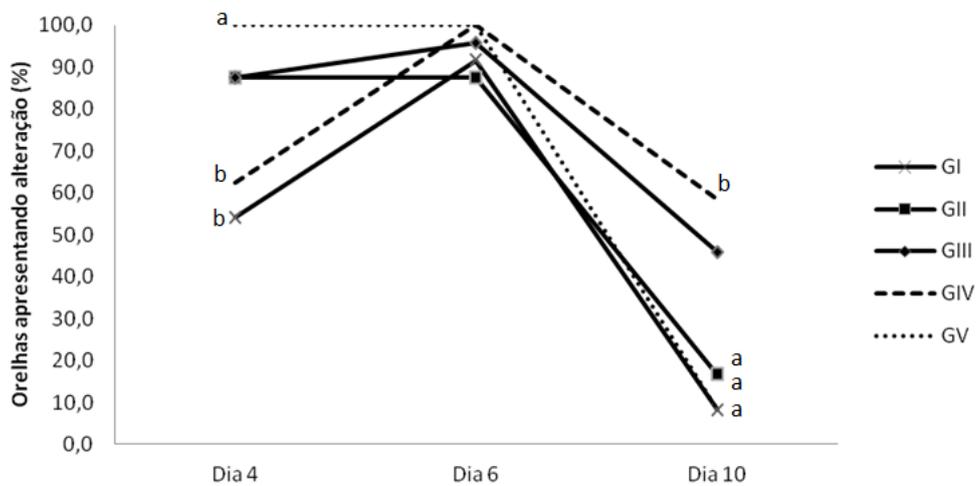


Figura 6

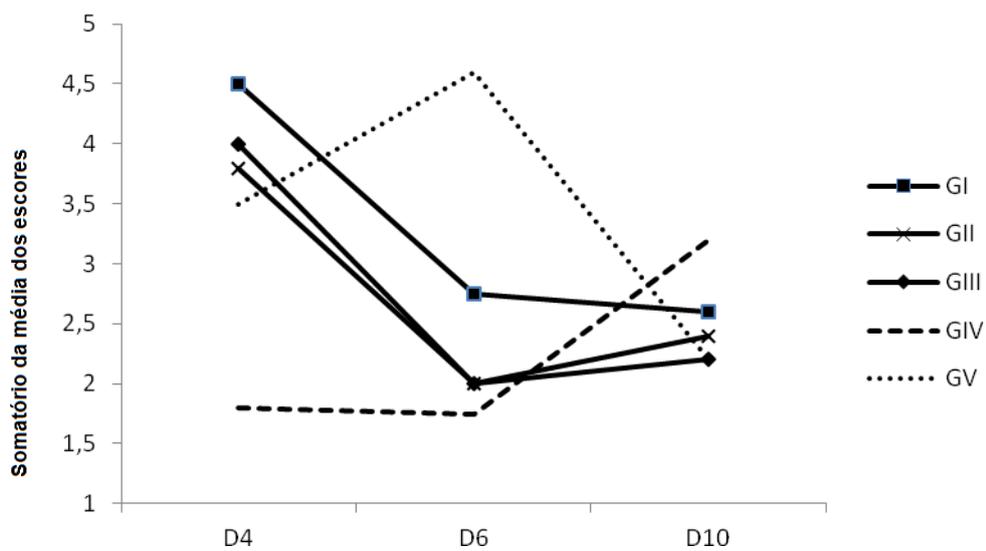


Figura 7

5 Conclusões

- Os extratos aquosos de *T. aestivum* e *R. officinalis* L. possuem efeito na diminuição dos sinais associados à otite externa infecciosa experimental, apresentando-se como possíveis auxiliares no tratamento da enfermidade;

- Através das técnicas utilizadas, foi possível a obtenção dos extratos aquosos de *Triticum aestivum* e *R. officinalis* L. e óleo essencial *R. officinalis* L.

- O extrato aquoso de *T. aestivum*, assim como o extrato aquoso de *R. officinalis* L. são capazes de diminuir o crescimento bacteriano nas concentrações de 12,5%; O óleo essencial de *R. officinalis* L. é capaz de diminuir o crescimento bacteriano na concentração de 2,5%.

- Os extratos aquosos de *T. aestivum* e *R. officinalis* L., são efetivos na diminuição dos parâmetros clínicos da otite externa infecciosa;

- Nas condições experimentais deste estudo, os tratamentos a base de extrato aquoso de *T. aestivum* e extrato aquoso e óleo essencial de *R. officinalis* L., não influenciaram os parâmetros histopatológicos para otite externa.

Perspectivas

Neste trabalho iniciamos uma nova perspectiva de tratamento eficaz para uma doença de extrema relevância na clínica veterinária de pequenos animais, principalmente quando considerarmos que, em diversos casos, medicamentos alopáticos não surtem mais os efeitos desejados ou, ainda, efeitos adversos são predominantes. Assim sendo, mais estudos são necessários para estabelecermos um protocolo terapêutico eficaz com aplicabilidade clínica.

Os resultados alçados denotam a importância da realização de estudos utilizando animais experimentais, anteriormente ao uso clínico de quaisquer compostos, mesmo que haja indicação popular.

A aplicabilidade clínica dos extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* na redução dos parâmetros macroscópicos por nós estudados pode ser uma realidade não distante. Ainda que estudos nas espécies alvo sejam desejados, é necessária uma maior compreensão do potencial toxicológico destes fitoterápicos, a fim de não expor os indivíduos alvo a riscos. Assim sendo, estudos que levem em consideração o potencial terapêutico advindo destas plantas

medicinais se fazem necessários, até mesmo visando à utilização de ambos os extratos em uma única formulação terapêutica, visando um possuir sinergismo de seus compostos.

6 Referências

AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Nutrire: revista de Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.35, n. 1, p. 129-148, 2010.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T.; LOGGIA, R. D.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.1718-1723, 2007

ALVARENGA, A. L.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BRAVO-MARTINS, C. E. C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.86-91, 2007.

ANDRARE, L. A., LUVIZOTTO, M. C. R.; SAKAMOTO, S. S.; SOUZA, T. F. B.; FERNANDES, M. A. R. Eficácia do extrato aquoso do *Triticum vulgare* no tratamento de radiodermatites geradas pelo uso da radioterapia em gatos. **Archives of Veterinary Science**. v.15, n.3, p.135-142, 2010.

BAPTISTA, T. C. C.; REIS, C. R.; TEIXEIRA, D. R.; MOURA, M. Diagnóstico de *Malassezia* sp em ouvidos de cães e sua correlação clínica. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v.09, n.09, p.48-55, 2010.

BARBIERI R. L.; STUMPF E. R. Origem e evolução de plantas cultivadas. 1 ed. Brasília: **Embrapa Clima Temperado**, p.820, 2008.

BELE, A. A.; JADHAV, V. M.; KADAM, V.J. Potential of tannins: a review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.4, p.209-214, 2010.

BENINCÁ, J. P.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. **Food Chemistry**, v.124, p.468-475, 2011.

BONZIN, B.; DUKIC, N. M.; SAMOJLIK, I. JOVIN, E. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n.55, p.7879–788, 2007.

BUGDEN, D. L. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. **Australian Veterinary Journal**. v.91, n.1-2, p.43-46,2012.

CHO, Y.; JEONG, J.; LEE, H.; KIM, M.; KIM, N.; LEE, K. Virtual otoscopy for evaluating the inner ear with a fluid-filled tympanic cavity in dogs. **Journal of Veterinary Science**. v.13, n.4, p.419-424, 2012.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; MADRID, I.; FONSECA, A. O.; ALVES, G. H.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. Perfil de susceptibilidade de leveduras do gênero *Candida* isolada de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.1, p.43-49, 2012.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard M7 – A6, 2005.

COLE, L. K. Anatomy and physiology of the canine ear. **Veterinary Dermatology**, n. 20, p. 412-421, 2009.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, 2006a.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; LARA, E. H. G.; MORAES, H. P. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.8, n.4, p.173-182, 2006b.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**. v.1, n.3, p.241-256, 2009.

DINELLI, G.; CARRETERO, A. S.; SILVESTRO, R. D.; MAROTTI, I.; FU, S.; BENEDETTELLI, S.; GHISELLI, L.; GUTIERREZ, A. F. Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1216, p.7229–7240, 2009.

DINELLI, G.; CARRETERO, A. S.; SILVESTRO, R. D.; MAROTTI, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D. A.; BENEDETTELLI, S.; GHISELLI, L.; GUTIERREZ, A. F. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1218, p.7670-7681, 2011.

FERNÁNDEZ, G.; BARBOZA, G.; VILLALOBOS, A.; PARRA, O.; FINOL, G. RAMIREZ, R.A. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v.16, n.1, p.23-30, 2006.

GALERA, P. D.; FALCÃO, M. S. A.; RIBEIRO, C. R.; VALLE, A. C. V.; LAUS, J. L. Utilization of the aqueous extract of *Triticum vulgare* (Bandvet®) after superficial keratectomy in domestic cats afflicted with corneal sequestrum. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.714-720, 2008.

GELLER, M.; FILHO, A. B.; CUNHA, K. S. G., SLAIBI, E. B.; ABREU, C. S.; BARBOSA, J. S. S. Avaliação imunodermatológica da resposta ao propilenoglicol e ao butilenoglicol - revisão bibliográfica sistemática. **RBM: Revista Brasileira de Medicina**, v.67, n.7, p.234-239, 2010.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v.24, n.2, p.395-406, 2010.

GRIFFIN, C. E. Otitis Techniques to Improve Practice. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.21, p.96-105, 2006.

GODEIRO, J. R. G.; BATISTA, J. S.; REIS, P. F. C. C.; OLINDA, R. G.; VALE, R. G.; CALADO, E. B.; BARROS, L. E. S.; OLIVEIRA, A. F.; FEIJÓ, F. M. C. avaliação da atividade cicatrizante de creme à base de *Triticum vulgare* em feridas cutâneas de gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.2, p.78-85, 2010.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v.26, p.279-288, 2007.

GUILLET, J.; HALLIER, M.; FELDEN, B. Emerging Functions for the *Staphylococcus aureus* RNome. **PLOS Pathogens**. v.9, n.12, 2013.

HEINE, P. A., Anatomy of the ear. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.34, p. 379-395, 2004.

HERNÁNDEZ, L., AFONSO, D.; RODRÍGUEZ, E. M.; DIAS, C. Phenolic Compounds in Wheat Grain Cultivars. **Plant Foods for Human Nutrition**. n.66, p.408-415, 2011.

HUNG, P. V.; HATCHER, D. W.; BARKER, W. Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities. **Food Chemistry**. v.126, p.1896-1901, 2011.

KHAN, G. M.; ANSARI, S. H.; AHMAD, F. Pharmacognostic standardization, antioxidant and free radical scavenging activity of the seeds of *Triticum aestivum* L. - A dietary staple. **Journal of Young Pharmacists**. n.5, p.54-59, 2013.

LEITE, C. A. L. A Avaliação Radiográfica no Diagnóstico da Otite Média em Caninos e Felinos. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação** v.1, n.1, p.35-43, 2003.

LINZMEIER, G. L.; ENDO, R. M.; LOT, R. F. E. Otite externa. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. ano VII, n.12, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. **Journal Veterinary Medicine**. n.54, p. 559–563, 2007.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. F.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1-2, p.33-39, 2008.

MALAYERI, G. Z.; S. JAMSHIDI; SALEHI, T. Z. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Communications**, v.34, 435-444, 2010.

MANISCALCO, C. L.; AQUINO, J. O.; PASSOS, R. F. B.; BÜRGER, C. P.; MORAES, P. C. Emprego da vídeo-otoscopia no diagnóstico de otite externa em cães. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2454-2457, 2009.

MATERA, J; FANTONI, D. T; TATARUNAS, A. C; ROMAN, M. A. L. Ensaio de avaliação de eficácia e de exequibilidade de uso de creme ou gaze impregnada com *Triticum vulgare* em feridas cutâneas. 1ª Fase experimental. 2ª Fase clínica. **Veterinary News**, v.2, 2002.

MENGONI, E. S.; VICHERA, G.; RIGANO, L. A.; PUEBLA, M. L. R.; GALLIANO, S. R.; CAFFERATA, E. E.; PIVETTA, O. H.; MORENO, S.; VOJNOV, A. A. Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. **Fitoterapia**. n.82 p.414-428, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2009.

MUELLER, E. N. **Avaliação e tratamento da otite externa canina**. 91f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

MUELLER, Eduardo Negri. **Microclima do canal auditivo de cães e efeito do *Rosmarinus officinalis* L. e do *Triticum vulgare* o tratamento da otite externa experimental**. 2011. 76f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MUELLER, E. N.; GUIOT, Ê. G.; TILLMANN, M. T.; CAMPELLO-FELIX, A. O.; PEREIRA, I. C.; SCHRAMM, R. C.; NOBRE, M. O. Avaliação do efeito da lavagem do canal auditivo externo em orelhas com otite externa purulenta bilateral. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.9, n.28, 147-150, 2011a.

MUELLER, E. N.; GUIOT, E. G.; WILHELM, G.; FERNANDES, C. P. M.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O. Otite externa ceruminosa e purulenta em cães. **A Hora Veterinária**, v.30, n.179, p.38-40, 2011b.

MURPHY, K. M. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.16, p.236-241, 2001.

NASCENTE, P. S.; CLEFF, M. B.; ROSA, C. S.; SANTOS, D. V.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO J. R. B. Otitis externa em pequenos animais: uma revisão. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.4, n.11, p.52-59, 2006.

NJAA, B. L.; COLE, L. K.; TABACCA, N. Practical Otic Anatomy and Physiology of the Dog and Cat. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.42, p. 1109-1126, 2012.

NOBRE, M.; MEIRELES, M.; GASPAR, L. F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L. F.; SOUZA, L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.447-452, 1998.

NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from rio grande do sul state, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p.245-249, 2001.

NUTTALL, T.; COLE, L.K. Ear cleaning: the UK and US perspective. **Veterinary Dermatology**, v.15, n.2, p.127-136, 2004.

OLIVEIRA, L. C.; MEDEIROS, C. M. O.; SILVA, I. N. G.; MONTEIRO, A. J., LEITE, C. A. L.; CARVALHO, C. B. M. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.405-408, 2005

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PENNA, B.; THOMÉ, S.; MARTINS, R.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. In vitro ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in rio de janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. n.42, p.1434-1436, 2011.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R., CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**. n.17, p.15-19, 2002.

RIBAS, L. M.; NOGUEIRA, C. E. W.; BEIRA, F. T. A.; ALBUQUERQUE, L. P. A. N.; KICKHÖFEL, I. A. Efeito cicatrizante do extrato aquoso de *Triticum vulgare* em feridas do tecido cutâneo de equinos. **A Hora Veterinária**. v.25, n.147, 2005.

ROSA, J. S.; FACCHIN, B. M.; BASTOS, J.; SIQUEIRA, M. A.; MICKE, G. A.; DALMARCO, E. M.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDRE T. S. Systemic Administration of *Rosmarinus officinalis* Attenuates the Inflammatory Response Induced by

Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy. **Planta Medica**. n.79, p.1605–1614, 2013.

ROSSER, E. J. Jr., Causes of otitis externa. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. n.34, p.459–468, 2004.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.43, n.6, p.413-423, 2007.

SANTOS, R. R. Sensibilidade *in vitro* da microbiota da orelha de cães com otite externa a cinco antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, n.2, p433-435, 2007.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIAS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, p.618-626, 2008.

SOLÓRZANO, O. T; HURTADO H. R; LÓPEZ J. L. V; PAQUENTÍN, J. Á; GARIBAY, M. V. Evaluación de la actividad reepitelizante del *Triticum vulgare* en la cervicitis crônica erosiva. **Revista de la Faculdade Medicina-UNAM**, v.44, n.1, p.79-83, 2001.

SOUZA, D. W.; MACHADO, T. S. L., ZOPPA, A. L. V.; CRUZ, R. S. F., GÁRAGUE, A. P.; SILVA, L. C. L. C. Ensaio da aplicação de creme à base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.8, n.3, p.9-13, 2006.

TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L. E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S. M.; DINIZ, S. P.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.4, p.741-746, 2008.

TILLMANN, M.T. **Anti-sépticos e fitoterápico na cicatrização de feridas**. 52f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

WENT, M.; HUANG, H.; XIE, Z.; LUTTERODT, H.; YU, L.; FUERST, E. P.; MORRIS, C. F.; YU, L. L.; LUTHRIA; D. Phytochemical Composition, Anti-inflammatory, and Antiproliferative Activity of Whole Wheat Flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.60, p.2129–2135, 2012.

7 Apêndice